

Estandarización de la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para el diagnóstico de *Strongyloides Stercoralis* a partir de muestras de heces

Standardization of the PCR (Polymerase Chain Reaction) for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* from stool samples

MsC. Minaya Galarreta, Angélica Karina*

*Docente de la Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica

Resumen

Este trabajo da cuenta de los aspectos más significativos en relación a la técnica de reacción en cadena de la polimerasa y su capacidad de diagnóstico de *Strongyloides stercoralis* en muestras de heces traídas del pueblo de Santa Clara en Iquitos en el período 2009-2010.

El objetivo general del trabajo de investigación es estandarizar el método de reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de *S. stercoralis*.

La metodología utilizada fue experimental con el fin de responder a los objetivos e interrogantes planteados y el diseño fue experimental-correlacional y es a simple ciego porque los resultados de las muestras de los pacientes a los cuales se les extrajo el ADN no se conocen si efectivamente eran positivos a *Strongyloides stercoralis*.

La población estuvo conformada por 175 pacientes con o sin síntomas clínicos consistentes con estrongiloidiasis y 120 muestras de ADN extraídas de muestras fecales dadas por la población en estudio.

La técnica para reportar los resultados fue a través del PCR y conjuntamente con métodos electroforéticos de visualización de dichos resultados, siendo el instrumento que se empleó un termociclador y un equipo completo de electroforesis.

El manejo de la base de datos y los análisis estadísticos fueron realizados utilizando Microsoft Excel ® y Stata 10.1TM (Texas 2008). La sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR se define como el porcentaje de verdaderos positivos y negativos con respecto a los resultados coprológicos (gold standard).

La conclusión fue que el método de reacción en cadena de la polimerasa permite diagnosticar *S. stercoralis* en muestras fecales a través del diseño de cebadores específicos en los genes que codifican los ARN ribosomales incluyendo sus regiones intergénicas (ITS). Para medir la sensibilidad y especificidad se tomo en cuenta el valor predictivo negativo y positivo, reportando un porcentaje de especificidad de 64% y sensibilidad de 97% ayudando a detectar este nemátodo en muestras que con métodos convencionales no se pudo reportar.

Palabras Claves: Diagnóstico. PCR. *Strongyloides stercoralis*.

Abstract

The present work evaluates the significant aspects in relation PCR technique and its diagnosis capacity of *Strongyloides stercoralis* in feces samples got of Santa Clara - Iquitos.

The general objective of this work is optimized the PCR technique in *S. stercoralis* diagnosis.

The methodology was experimental in order to responded to objectives and requests; the design was experimental- correlation and it was a single-blind because the results of DNA patient samples nobody knows if these samples were really positive to *Strongyloides stercoralis*.

The population was constituted by 175 patients whit or without clinical symptoms in relations of strongyloidiasis, being considered a representative sample of 120 DNA extracted samples of feces give us of the population in study.

The technique used for report results of diagnosis was PCR and electroforetic methods in order to visualize these results; the tool was a termocycler and electroforetic equipment complete.

The data base and statistical analysis were realized used Microsoft Excel ® and Stata 10.1TM (Texas 2008). The PCR sensibility and specificity from detected *S. stercoralis* is the really positive and negative percentage with respect feces samples results (gold standard).

The conclusion was that polymerase chain reaction technique diagnoses *S. stercoralis* in faecal samples by designing specific primers in genes encoding ribosomal RNA including its intergenic regions (ITS). To measure the sensitivity and specificity were taking into account the positive and negative predictive value, reporting a specificity rate of 64% and sensitivity of 97% helping to identify this nematode in samples with conventional methods failed to report.

Keywords: Diagnosis. PCR. *Strongyloides stercoralis*.

INTRODUCCIÓN

Strongyloides stercoralis es un nematodo intestinal común que se encuentra ampliamente diseminado en las áreas tropicales y subtropicales. El género *Strongyloides* está clasificado en el orden Rhabditida, la mayoría de los miembros son nemátodos que viven en el suelo. Existen 52 especies de *Strongyloides*, pero la mayoría no infecta a los humanos. *S. stercoralis* es el patógeno más común para los humanos. La hembra adulta es muy pequeña y casi transparente; habita en túneles formados entre los enterocitos del intestino delgado humano (1,2).

La strongyloidiasis está presente entre 30 a 100 millones de personas en regiones tropicales y subtropicales en todo el mundo; la enfermedad es endémica en África, Asia, Asia Sur-Oriental, central y América del Sur. *S. stercoralis* se comporta como un patógeno oportunista en pacientes inmunocomprometidos por tumores malignos, malnutrición grave, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), terapia con corticosteroides y trasplante renal; produciendo en ellos infecciones diseminadas que comprometen la vida. Estudios en Japón y Jamaica demostraron una asociación significativa entre la presencia de infección por *S. stercoralis* e infección por HTLV-1. En un estudio

peruano, 86% de los pacientes con hiperinfección por *S. stercoralis* tuvieron infección por HTLV-1 como única condición aparente de inmunosupresión (4).

La infección ocurre cuando las larvas del parásito en su estadio filariforme (estadio infeccioso) penetran a la piel intacta. La vía de ingreso más común sucede cuando los pies descalzos del hospedero toman contacto directo con el suelo contaminado de larvas de Strongyloides. La mayoría de personas infectadas presentan un cuadro asintomático con infección crónica del aparato gastrointestinal. Sin embargo, debido a la capacidad única que tiene *S. stercoralis* de completar su ciclo vital dentro del hospedero (autoinfección), la carga de parásitos puede aumentar dramáticamente durante el proceso de infección. La autoinfección puede conducir a la persistencia de la enfermedad así como al síndrome de hiperinfección (síndrome de distrés respiratorio agudo, infiltrado pulmonar observado en exámenes radiográficos con un rápido deterioro clínico), en la cual la enfermedad se disemina en medio de la inmunidad celular deteriorada, el cual podría tener un efecto letal para el hospedero (1,3).

La enfermedad usualmente es diagnosticada a través de la microscopia directa de heces, en vista de lo módica que constituye la técnica. Este es un proceso que toma un tiempo prolongado, debido a que los pacientes deben de llevar sus muestras frescas de heces durante varios días, cuanto más muestras sean analizadas, mayor será la probabilidad de detectar dicho parásito. Además de necesitar la presencia de técnicos de laboratorio experimentados que puedan diferenciar a simple vista la morfología del nemátodo en estudio con otros como *Necator americanus* y *Ancylostomaduodenalis*, la diferenciación de éstos radica en la forma de la cavidad bucal, la presencia de dientes y el número de los mismos, la morfología esofágica y la determinación del sexo, se necesitaría por lo tanto de mayor tiempo, experiencia y buena observación para poder dar un diagnóstico acertado del tipo de nemátodo que se está tratando de identificar (5,6,16,21, 22, 23,24).

En la actualidad los métodos de diagnóstico que se han caracterizado por su practicidad y sensibilidad, son las técnicas moleculares, una de ellas es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); dicha técnica amplifica secuencias específicas de ADN con excepcional especificidad. Para el caso de *S. stercoralis*, la selección de regiones de ADN convenientes ha sido siempre un desafío; una región que refleja fielmente relaciones filogenéticas y que se pueda multiplicar selectivamente por PCR con mucha facilidad son las regiones ribosomales conformadas por los segmento espaciadores de transcripción interna o las conocidas como Internal Transcribed Spacer (ITS), estas regiones si bien es cierto no producen proteínas se caracterizan por su alto contenido de información, y las regiones subribosomales: 18S, 5.8S y 28S (7,8,9,10,11,12,13,14,15,17,18,19,20,25,26,27,28).

En este estudio se estandarizará y optimizará la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores a diseñar en las regiones ribosomales del parásito, como controles serán usados: ADN purificado de *S. stercoralis*, así como también ADN extraído de otros nemátodos, lo cuales han sido acertadamente identificados como tales por morfología, PCR y restricción enzimática, posterior a esto, se procederá a evaluar la técnica en mención amplificando ADN de muestras de heces recolectadas de pacientes con probable infección parasitaria con diagnóstico previo por microscopía provenientes de la comunidad de Santa Clara en el departamento de Iquitos, la

comparación de resultados nos ayudará a elegir una mejor técnica con la finalidad de realizar un diagnóstico preciso y rápido de Strongiloidiasis, para evitar complicaciones fatales de dicha enfermedad.

METODOLOGÍA

CLONACIÓN DE ADN DE *Strongyloides stercoralis*

La preparación del DNA va a depender del organismo del que proceda. Para este estudio no fue extraído de un ser unicelular sino pluricelular (parásito) la técnica usada fue mediante glass beads, la misma que se usó para la extracción de ADN de este organismo en las muestras de heces. Para la extracción del ADN de *Strongyloides stercoralis*, las muestras conservadas a -20 °C fueron descongeladas y homogenizadas. Se alicuotó de la muestra 500 ul en un tubo de Eppendorf de 1.5 ml, luego se centrifugó a 15 000 rpm por 10 min. Se descartó el sobrenadante y se disolvió el sedimento en 250 ul de buffer de lisis (100mM Tris-HCl pH 8, 100 mM EDTA, 0.5 % SDS). Luego se agregó 40 ul de Proteinasa K (20 ug/ml) y 250 mg de perlas de vidrio (BioSpecProducts, Inc., 0.1 mm) y se homogenizó la mezcla. Luego se agitó la muestra con las perlas de vidrio en el mini beader continuamente por 5 minutos. Luego se incubó las muestras a -70 °C por 5 minutos. El paso 4 se repitió dos veces más. Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente por 1-2 minutos y se centrifugó a 15 000 rpm (máxima velocidad en nuestra centrifuga) por 30 segundos. Cuidadosamente se procedió a aspirar el sobrenadante teniendo en cuenta no tocar con la punta del tip las perlas de vidrio ni el sedimento y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. Se agregó 40 ul de proteinasa K e incubó a 56 °C toda la noche. La muestra contenida en el buffer de lisis se mezcló bien y se agregó 250 ul de una solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en proporciones 25:24:1, luego se procedió a homogenizar con mucho cuidado de no deteriorar las hebras de ADN y se centrifugó a máxima velocidad (15 000 rpm) por 10 minutos. Se aspiró con cuidado 200 ul del sobrenadante, y se transfirió a un nuevo tubo al cual se agrega 200 ul de la solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se homogenizó cuidadosamente y se centrifugó a máxima velocidad (15 000 rpm) por 10 minutos. Se aspiró 200 ul del sobrenadante y se agregó 400 ul de una solución de cloroformo-alcohol isoamílico en proporciones 24:1, se homogenizó cuidadosamente y se centrifugó a máxima velocidad (15 000 rpm) por 10 minutos. Se aspiró 200 ul del sobrenadante y agregó 220 ul de alcohol absoluto así como también 20 ul de acetato de sodio 3M y se incubaron a -70 °C por un mínimo de una hora y centrifugó a máxima velocidad por 10 minutos. Luego se resuspendió en 500 ul de etanol al 70% y centrifugó a máxima velocidad por 10 minutos. Este último paso se vuelve a repetir. Se descartó el sobrenadante y se puso a secar sobre una superficie ligeramente caliente. Cuando el sedimento se tornó seco se procedió a resuspender en 40 ul de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA).

La amplificación de secuencias ADN que contienen las regiones espaciadoras ITS1, ITS2 y el gen 5.8S, que se han convertido en marcadores moleculares para numerosas especies de Strongyloides, se llevó a cabo con los iniciadores ITS-1 (5'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G3'), ITS-4 (5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC3') propuestos por (WHITE et al., 1990;

SARTORATO, et al., 2006). La mezcla de reacción se llevó a cabo en 25µl que contenían de 100 a 200 ng de ADN, 800 µM de la mezcla dNTP's, 1,5 unidades de Taq polimerasa (invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 µM de cada iniciador y 2 µl del buffer 10X. La amplificación se realizó en un termociclador (Bio-Rad PTC-200) con el siguiente perfil térmico: desnaturalización inicial de 94°C x 2,5 min, seguido de 35 ciclos de: Anillamiento: 60°C x 40 s, Extensión: 72°C x 30 s, Denaturación: 94°C x 30 s, y una elongación final de 72°C por 5 minutos. Los productos de amplificación se separaron en geles de agarosa de 1%.

El ADN obtenido por el PCR (Reacción en cadena de polimerasa) se extrajo del mismo gel mediante un kit DNA Qiagen Gel Extraction. El producto de esta extracción fue sometida a digestión por endonucleasas de restricción. Las endonucleasas de restricción utilizadas fueron EcoRI. El plásmido bacteriano usado fue el pBR322. La transformación fue mediada por Ca²⁺. Esta transformación consistió en tratar la membrana del E. coli, que usualmente es muy impermeable, con Cl₂Ca a 0°C. Después un corto choque térmico a 42°C favoreció la incorporación del DNA. Las células se recuperaron por incubación en un medio completo a 37°C durante 1h antes de ser sembradas en el medio selectivo correspondiente. Se seleccionaron aquellas colonias bacterianas que expresaron el DNA recombinante detectando las que crecieron en medios de cultivo con ampicilina y confirmando las mismas que no crecieron en medio con tetraciclina.

SECUENCIAMIENTO DEL ADN CLONADO:

El método usado fue el método enzimático de Sanger, el cual, fue realizado por la empresa Macrogen (Advancing through Genomics) en la ciudad de Maryland en Estados Unidos. Se basa en la síntesis enzimática a partir de un primer (cebador), de secuencia complementaria a una molécula de DNA molde, por acción de una DNA polimerasa que va incorporando, al extremo 3' de la cadena en crecimiento, dNTPs (2'-desoxinucleótidos, de los cuales uno debe estar marcado) y ddNTPs (2',3'-didesoxinucleótidos) que difieren de los anteriores en que les falta el grupo hidroxilo del carbono 3' del azúcar, esto significa que su incorporación impide la formación del enlace fosfodiéster entre la cadena en crecimiento y el siguiente nuevo nucleótido.

DISEÑO DE CEBADORES:

El diseño de cebadores para la técnica del PCR es fundamental para que el desarrollo de la reacción sea correcto y fructífero. Los parámetros que se tomaron en cuenta a la hora del diseño de los cebadores fueron: cálculo correcto de la temperatura: $T_m(\text{productos}) - T_m(\text{menos estable}) < 20^\circ\text{C}$, longitud de los cebadores, comparación de cebadores entre sí y entre ellos: crítico para que no se produzcan dímeros de cebadores, autoalineamientos. El programa OLIGO es un software para diseñar y analizar cebadores para PCR y para secuenciación, dicho programa fue utilizado para el diseño de los cebadores utilizados en el estudio. Para realizar los alineamientos del cebador con otras secuencias nucleotídicas de otras especies se utilizaron los programas Clustal X y Blast.

ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DEL PCR:

En base a un programa de ciclamiento y diferentes concentraciones de reactivos de la mezcla maestra (Master Mix) se eligió los pares de cebadores específicos para *Strongyloides stercoralis*. Y para medir la sensibilidad con el ADN extraído con el método de glass beads a diferentes cantidades de parásitos (*Strongyloides stercoralis*) se realizó diferentes diluciones en base a una concentración conocida de esta muestra de ADN, se realizó la amplificación a cada una de esas diluciones hasta determinar el nivel de detección de la técnica observando presencia de amplificación en las muestras más diluidas de ADN.

MUESTRAS:

Estuvo conformada por la población de 120 muestras de ADN extraídas de muestras fecales dadas por la población del estudio en el pueblo de Santa Clara - Iquitos en los años 2009-2010. Es representativa, en el presente estudio se consideró a 120 pacientes tomando como criterio de inclusión: mayores de 3 años y criterio de exclusión: pacientes mayores de 60 años.

RESULTADOS

CLONACION Y SECUENCIAMIENTO:

Se logró clonar y secuenciar las regiones intergénicas ITS1, ITS2 así como las secuencias conservadas 5.8 S 18 S y 28S. A partir de las cuales se diseñaron los cebadores (Fig. 1).

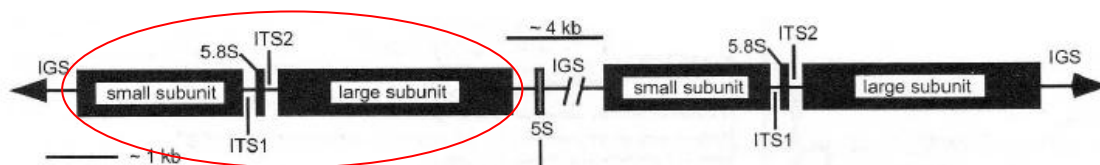


Fig. 1.- Regiones elegidas para la clonación y secuenciamiento de *Strongyloides stercoralis*.

PRIMER SISEÑADOS PARA EL NESTED PCR:

Los primers que fueron diseñados por el programa Oligo fueron: para la primera amplificación 5'ATAATGAGCATCTTGGATGTTATTTAATCA 3' y 5'TATCCAGAGGCAGGAAGAGATGTAATA 3'; para la segunda amplificación 5'TTGATTCCGATAACGAGCGAGACTTTTATG 3' y 5'GGAAGTGAAGCAATATCCAGAGGCAGGA 3'

NESTED-PCR ESTANDARIZADO:

El perfil térmico que detectó mayor cantidad de ADN para *Strongyloides stercoralis* sin ocasionar cruces con otras especies (Fig.2) fue el siguiente: desnaturalización inicial de 94°C x 5 min, seguido de 35 ciclos de

reconocimiento: 52°C x 60 s, extensión: 72°C x 60 s, desnaturalización: 94°C x 60 s, y una elongación final de 72°C por 5 minutos; para la primera amplificación, para la segunda amplificación el perfil térmico fue el siguiente: desnaturalización inicial de 94°C x 5 min, seguido de 35 ciclos de reconocimiento: 58°C x 60 s, extensión: 72°C x 60 s, desnaturalización: 94°C x 60 s, y una elongación final de 72°C por 5 minutos, ambas ciclaciones fueron realizadas en el termociclador (Bio-Rad PTC-200). La mezcla de reacción se llevó a cabo en 25µl que contenían de 100-200 ng de ADN, 800 µM de la mezcla dNTP's, 0.2 unidades de Taq polimerasa (invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂, 0.5 µM de cada iniciador y 2.5 µl del buffer 10X. El fragmento de ADN amplificado fue de 375 bp. La electroforesis fue realizado en un gel de agarosa de 1.5 %.

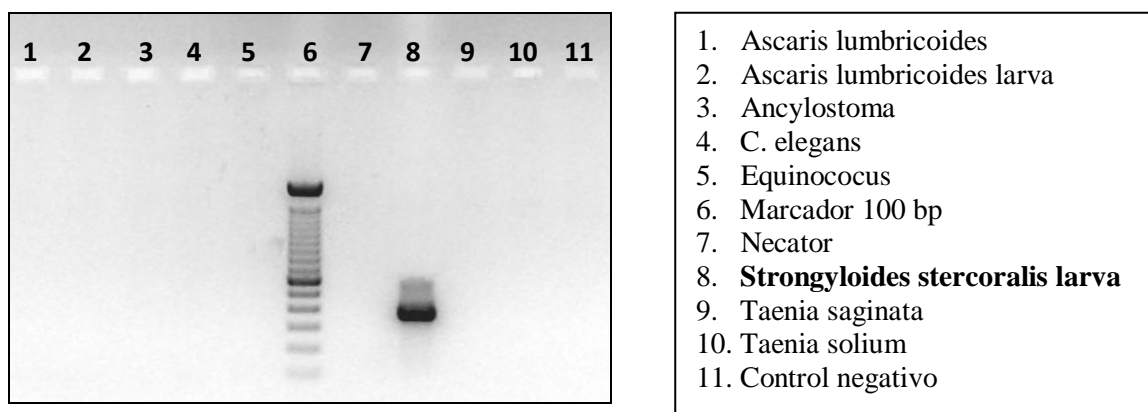


Fig. 2.- Nested PCR realizado con lo cebadores diseñados y con el perfil térmico estandarizado.

ANÁLISIS, TABLAS Y GRÁFICAS ESTADÍSTICAS:

El manejo de la base de datos y los análisis estadísticos fueron realizados utilizando Microsoft Excel ® y Stata 10.1TM (Texas 2008). La sensibilidad de la técnica de PCR para detectar *S. stercoralis* se define como el porcentaje de verdaderos positivos y la especificidades el porcentaje de verdaderos negativos con respecto a los resultados coprológicos (gold standard). Los 95% de intervalos de confianza (95% CI) se calcularon mediante métodos estándares.

Cuadro 1.- Sensibilidad y Especificidad de PCR para detectar *S. stercoralis*

		<i>S. Stercoralis</i>		Total
		Positivo	Negativo	
PCR	Positivo	36	30	66
	Negativo	1	54	55
Total		37	84	121

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Positivos detectados por PCR}}{\text{Total de positivos}} = \frac{36}{37} = 0.973$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Negativos detectados por PCR}}{\text{Total de negativos}} = \frac{54}{84} = 0.643$$

Sensibilidad (95% CI) = 97.30% (85.83% – 99.93%)

Especificidad (95% CI) = 64.30% (53.08% - 74.44%)

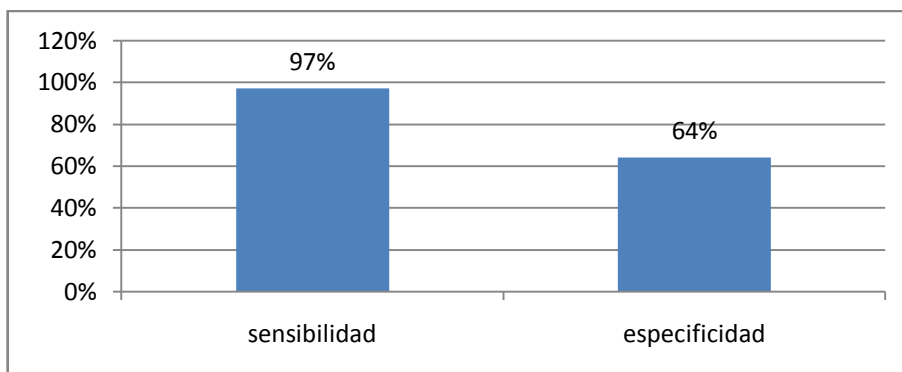


Fig. 3.- Sensibilidad y Especificidad de PCR para detectar *S. stercoralis*. **Fuente propia del mismo estudio:** según los cálculos estadísticos la sensibilidad de la técnica reporta mayor sensibilidad que especificidad.

Cuadro 2.- Resultados de otros parásitos encontrados

	Total	S. stercoralis +		S. stercoralis ‡	
		Positivo (n=37)	Negativo (n=84)	Positivo (n=66)	Negativo (n=55)
Ascarislumbricoides	7	1	6	1	6
Ancylostoma	13	0	13	0	13
Trichuristrichura	10	0	10	0	10

+ Examen coprológico

‡Resultados de PCR

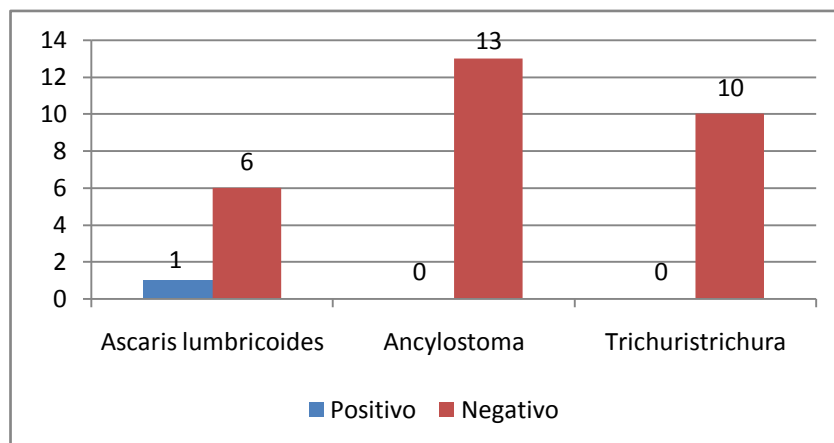


Fig. 4.- Resultados positivos y negativos del examen coprológico. **Fuente propia del mismo estudio:** según los resultados el método coprológico reporta una infección mixta de *S. strongyloides* con *A. lumbricoides*.

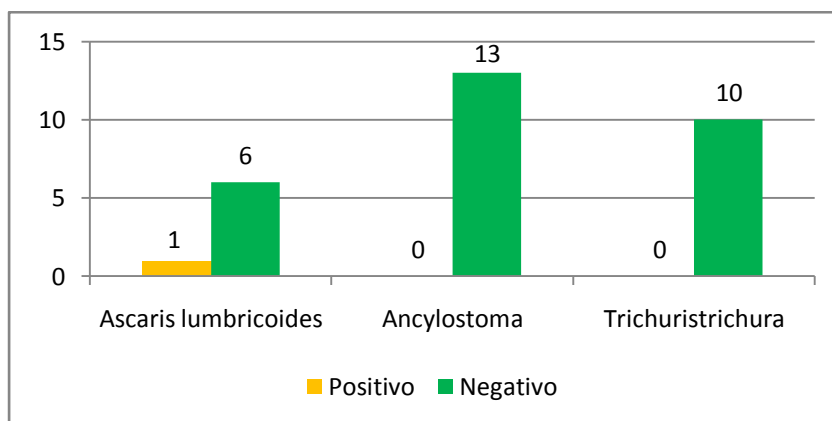


Fig. 5.- Resultados positivos y negativos del examen coprológico vs. PCR. **Fuente propia del mismo estudio:** según los resultados la técnica de PCR reporta una infección mixta de *S. strongyloides* con *A. lumbricoides*, resultados consecuentes con los obtenidos en el método coprológico.

CONCLUSIONES

El método de reacción en cadena de la polimerasa permite diagnosticar *S. stercoralis* en muestras fecales colectadas de Santa Clara-Iquitos en los años 2009-2010 a través del diseño de cebadores específicos en regiones intergénicas.

Los cebadores específicos influyeron en el diagnóstico de *S. stercoralis*, los cuales se diseñaron basados en los genes que codifican los ARN ribosomales incluyendo sus regiones intergénicas (ITS), dicha especificidad se confirmó debido a que en los alineamientos demostraron que los ARN ribosomales son regiones conservadas, respaldando la especificidad de dichos cebadores para la especie *Strongyloides sp.*

La sensibilidad y especificidad influyeron en el diagnóstico de *S. stercoralis* tomando en cuenta el valor predictivo negativo y positivo a partir de muestras fecales colectadas del pueblo de Santa Clara-Iquitos, lo cual evito diagnosticar equivocadamente otros parásitos, y esto estuvo respaldado por un porcentaje de especificidad de más de un 50% (64%) y una sensibilidad de 97% ayudando a detectar este nemátodo en muestras que con métodos convencionales no se pudo reportar.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- (1) JACO J. Verweij, Molecular tools in the diagnosis of intestinal parasitic infections, United Kindong, 2004, pp 83- 92.
- (2) SUE Lim, Kevin Katz, Sigmund Kraiden, Milan Fuksa, Jay S. Keystone, Kevin C. Kain, Complicated and fatal *Strongyloides* infection in Canadians: risk factors, diagnosis and management. Canadian Medical Association Journal; 2004, 171:479-84.
- (3) VINEY M. E., The biology and genomics of *Strongyloides*. Med Microbiol Immunol; 2006, 195:49-54.
- (4) SIDIQI Afzal A. and Steven L. Berk, Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* Infection. Travel Medicine, 2001, 33, (1 October):1040-47.
- (5) HIRA P. R., Al-Ali F., Shweiki H. M., Strongyloidiasis: challenges in diagnosis and management in non-endemic Kuwait. Annals of Tropical Medicine & Parasitology; 2004, 98:3:261-270.
- (6) VERWEIJ Jaco J., Molecular Tools in the diagnosis of intestinal parasitic infections, Geborente Berkel en Rodenrijs, Nijmegen, 2004, p 84-92.
- (7) MAKEDONKA Mitreva, James P. Mc Carter, John Martin, Mike Dante, Todd Wylie, Brandi Chiapelli, Deana Pope, Sandra W. Clifton, Thomas B. Nutman and Robert H. Waterston, Comparative Genomics of gene Expression in the Parasitic and Free-Living nematodes *Strongyloides stercoralis* and *Caenorhabditis elegans*. Genome Research; 2006, 14: 209-220.
- (8) MIN Hu, Neil B. Chilton, Robin B. Gasser, The mitochondrial genome of *Strongyloides stercoralis* (nematode)-idiosyncratic gene order and evolutionary implications. International JournalforParasitology; 2003, 33: 1393-1408.
- (9) PUTLAND R. A., Thomas S. M., Grove D. I. and Johnson A. M., Analysis of the 18S Ribosomal RNA Gene of *Strongyloides stercoralis*. International Journal of Parasitology; 1993, 23:149-151.
- (10) RAMACHANDRAN Srinivasan, Gam Albert A. and Neva Franklin A., Molecular differences between several species of *Strongyloides* and comparison of selected isolates of *S. stercoralis* using a Polymerase Chain

Reaction – Linked Restriction Fragment Length Polymorphism Approach. American Journal Tropical of Medicine and Hygiene; 1997, 56: 61-65

- (11) ROBIN B. Gasser, Neil B. Chilton, Hervé Hoste and Ian Beveridge, Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminthes. NucleicAcidsResearch; 1993, 21(10): 2525-26.
- (12) SRINIVASAN Ramachandran, Albert A. Gam and Franklin A. Neva, Molecular differences between several species of Strongyloides and Comparison of selected isolates of S. Stercoralis using a Polymerase Chain Reaction-Linked restriction fragment length polymorphism approach. Journal Tropical Medicine and Hygiene; 1997, 56(1):61-65.
- (13) YOUNG Irene and Coleman W. Annette, The advantages of the ITS2 region of the nuclear rDNA cistron for analysis of phylogenetic relationships of insects: a Drosophila example. Molecular Phylogenetics and Evolution; 2003, 30: 236-242
- (14) TORRES Tejada, Alfredo G.; Eugenia Baca, Beatriz, Reacción en Cadena de La Polimerasa. Elementos, España, 1995, 3:16-21.
- (15) CHUMPITAZ Hernandez, Rosa María, Utilidad del PCR para detectar a *Campylobacter jejuni* directamente de muestras de heces. Tesis para optar el título profesional como licenciado en Tecnología Médica con mención a Laboratorio Clínico. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima –Perú, 1997.
- (16) GIL Merino, Ana Isabel, *Vibrio parahaemolyticus* asociado a gastroenteritis en pacientes hospitalizados. Tesis para optar el grado de Magister en Ciencias con mención en Microbiología. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima-Perú, 2007.
- (17) ORTEGA Martínez, Martha Graciela, Evaluación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en el diagnóstico de Brucelosis, estimando el espectro de infección en humanos en una zona endémica. Tesis para optar el grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética. Universidad Autónoma de Nueva León. España, 1997.
- (18) BLOCH, W., A Biochemical Perspective of the Polymerase Chain Reaction. Biochemistry; 1991, 30:2735-2747.
- (19) BARRERA, H.A., Ortiz R., Rojas A. y Resendez, D.; Reacción en Cadena de la Polimerasa. Una época dorada en biología molecular. Ciencia y Desarrollo; 1993, 18:50-60.
- (20) ERLICH, H.A., Gelfand D. y Sninsky, J., Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction, Science, 1991, 252:1643-1651.

- (21) ERLICH, H.A. y Arnheim, N. , Genetic Analysis using the Polymerase Chain Reaction. Annual Review of Genetics, 1992, 26: 479-506.
- (22) PERSING, D.H., Smith, T.F. y White, T.J., Diagnostic molecular microbiology. Principles and application. Ed American Society and Microbiology, Washington D.C, 1993.
- (23) STEFFAN, R.J. y Atlas, R.M., Polymerase Chain Reaction: Applications in Environmental Microbiology. Annual Review of Microbiology, 1991, 45:137-161.
- (24) AFZAL A. Siddiqui and Steven L. Berk, Diagnosis of Strongyloides stercoralis Infection. Travel Medicine; 2001, 33:1040-1045
- (25) ZHU Xingquan, Gasser Robin B. and Chilton, Differences in the 5.8S rDNA sequences among ascarid nematodes. International Journal for Parasitology; 1998, 28:617-622
- (26) ROMSTAD A., Gasser R. B., Monti J. R., Polderman A. M., Namen P., Pit D. S. S. and Chilton N. B., Differentiation of Oesophagostomum bifurcum from Necator americanus by PCR using genetic markers in spacer ribosomal DNA. Molecular and Cellular Probes; 1997,11:169-76.
- (27) VERWEIJ J. J., Pit D. S. S., van Lieshout L., Baeta S. M., Dery G. D., Gasser R. B. and Polderman A. M., Determining the prevalence of Oesophagostomum bifurcum and Necator americanus infections using specific PCR amplification of DNA from faecal samples. Tropical Medicine and International Health; 2001, 6:726-731.
- (28) MELVILLE Lewis A., Alex M. Sykes, James S. McCarthy, The β -tubulin genes of two Strongyloides species. Experimental Parasitology; 2006, 112: 144-151.

FUENTES DE INTERNET:

Normativas legales para el derecho al desarrollo tecnológico y científico (fecha de acceso 03 de septiembre del 2011). URL disponible en:
http://www.vinv.ucr.ac.cr/docs/normativas/ley_7169.doc